

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 juillet 1997 (21.07.97)	
Demande internationale no PCT/FR96/02041	Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB95 CNR KDR
Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 décembre 1996 (20.12.96)	Date de priorité (jour/mois/année) 21 décembre 1995 (21.12.95)
Déposant PLOUET, Jean etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

25 juin 1997 (25.06.97)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Eugénia Santos

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

09/09/861

PCT/FR96/02041

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION CONCERNANT LA
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

17 août 1998 (17.08.98)

Demande internationale no

PCT/FR96/02041

Date du dépôt international

20 décembre 1996 (20.12.96)

Déposant

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE etc

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

_____ copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3a))

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Marc Salzman

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

GROSSET-FOURNIER
& DEMACHY
11. JUL. 1997
RECU

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

GROSSET-FOURNIER, Chantal
Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L.
103, rue La Fayette
F-75481 Paris Cédex 10
FRANCE

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 03 juillet 1997 (03.07.97)		AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB95 CNR KDR		
Demande internationale no PCT/FR96/02041	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 décembre 1996 (20.12.96)	Date de priorité (jour/mois/année) 21 décembre 1995 (21.12.95)
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 29, la demande internationale aux offices désignés suivants:
EP,JP,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
Aucun

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 03 juillet 1997 (03.07.97) sous le numéro WO 97 23510

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la **demande d'examen préliminaire international** doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC 09 OCT 1997

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB95 CNR KDR	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR96/02041	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20/12/1996	Date de priorité (jour/mois/année) 21/12/1995
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K16/42		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et al		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☒ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 25/06/1997	Date d'achèvement du présent rapport 07.10.97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé Goetz, M N° de téléphone (+49-89) 2399-8697 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR96/02041

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-25 version initiale

Revendications, N°:

1-15 version initiale

Dessins, feuilles:

1/7-7/7 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR96/02041

II. Priorité

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :

- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.

2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
☐ les revendications nos .

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications nos en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications nos en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications nos en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications nos en question.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR96/02041

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
 - ☐ limité les revendications.
 - ☐ payé des taxes additionnelles.
 - ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
 - ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.
3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,
 - ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
 - ☐ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :
 - ☐ toutes les parties de la demande.
 - ☐ les parties relatives aux revendications nos .

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR96/02041

V. Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1 - 15
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1 - 15
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1 - 15
	Non : Revendications

2. Citations et explications

Voir la feuille séparée, paragraphe 1.

VI. Certain documents cités

1. Certains documents publiés (règle 70.10)

Voir la feuille séparée, paragraphe 2.

2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

1. L'administration chargée de l'examen préliminaire international considère que l'objet des revendications 1 - 15 n'est ni décrit ni suggéré dans les documents cités dans le rapport de recherche préliminaire international et satisfait donc aux conditions énoncées aux articles 33(2) et (3) PCT.

Le document **D1 = J. Cell. Biochem. Sup. 18A, 1994, p. 328 XP000602723, abrégé EZ311**, décrit la préparation d'anticorps anti-idiotypiques du VEGF; cependant, il ne contient aucune information relative à leurs propriétés.

En effet, à la lecture de l'abrégé **D1**, l'existence d'anticorps anti-idiotypiques du VEGF étant un ligand spécifique de KDR (ou Flk-1) et non deflt (revendication 9) ou ayant les caractéristiques spécifiques selon la revendication 10 n'était pas du tout évident.

En outre, les caractéristiques techniques essentielles des revendications 1 et 2 ("sans stimuler les cellules endothéliales quiescentes" et "stimulation **sélective** du récepteur KDR") ne sont nullement mentionnées dans les documents de l'art antérieur disponibles .

Puisque toutes ces caractéristiques confèrent audits anticorps une panoplie d'avantages techniques imprévus (voir les pages 5 - 6 de la description), l'objet des revendications 1 - 15 implique une activité inventive.

2. Le document **D2 = C.R.ACAD.SCI.Paris, Science de la vie 319, mai 1996, pages 411 - 415** a été publié avant la date de dépôt, mais après la date de priorité de la présente demande.

A condition que la date de priorité revendiquée puisse-t'être accordée, **D2** n'appartient pas à l'état de la technique défini à la règle 64(1) PCT.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DU FACTEUR DE CROISSANCE ENDOTHELIALE VASCULAIRE ET LEUR UTILISATION COMME MEDICAMENTS.

5 L'invention a pour objet des anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire et leur utilisation comme médicaments.

Le VEGF (vascular endothelial growth factor, c'est-à-dire : du facteur de croissance endothéliale vasculaire) est actuellement reconnu comme l'acteur majeur des néovascularisations non contrôlées observées dans la progression tumorale (revue dans Folkman), la rétinopathie diabétique (Malecaze, 1994) ou la polyarthrite rhumatoïde (Fava, 1994). Il s'agit d'une glycoprotéine de 46 kDa se liant à l'héparine (Plouët Ferrara Connolly). Au moins 3 formes homodimères de 121, 165 et 189 acides aminés sont générées par épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Le VEGF de 165 acides aminés sera désigné par VEGF 165. Outre son rôle angiogénique le VEGF stimule la perméabilité capillaire (Connolly, 1989). Le rôle du VEGF dans la tumorigénèse a été suspecté par l'observation que l'hypoxie accompagnant la nécrose tumorale augmentait l'expression de ses ARNm. D'autre part le VEGF est surexprimé dans de nombreux cas de pathologie tumorale. De plus l'injection d'anticorps anti-VEGF inhibe la croissance de tumeurs (Kim, 1993).

Or un facteur de croissance peut induire de nombreux effets différents selon qu'il se lie à l'un ou à l'autre de ses récepteurs, par exemple la prolifération et la survie. Donc l'immunoneutralisation peut avoir des effets bénéfiques en inhibant la prolifération mais aussi des effets indésirables en diminuant la survie. L'analyse des fonctions médiées *in vivo* par un récepteur de facteur de croissance se liant à l'héparine tels que le VEGF ou les FGFs (fibroblast growth factor) se heurte à deux écueils majeurs. D'une part la combinatoire des interactions entre ligands et récepteurs est fort complexe car un facteur de croissance peut se lier à plusieurs récepteurs et de même plusieurs facteurs de croissance peuvent se lier à un même récepteur. Ainsi les produits de 9 gènes codant pour les FGFs disposent des produits de 5 gènes codant pour des récepteurs des FGFs. D'autre part leur forte affinité pour les glycosaminoglycanes fait que les facteurs de croissance tels que VEGF ou FGF sont séquestrés dans les matrices extracellulaire et ne sont retrouvés qu'au voisinage immédiat (moins de 0,5 mm) de leur lieu de synthèse ce qui rend difficile l'appréhension de leur rôle *in vivo*.

Deux gènes différents codent pour des tyrosine kinases transmembranaires identifiées comme des récepteurs du VEGF : le KDR chez l'homme (Terman, 1992) ou le flk-1 chez la souris (Millauer, 1993) et le flt-1 (DeVries, 1992).

Il a été montré que les ARN messagers du récepteur flk-1 étaient présents
5 dans les cellules endothéliales lors de l'embryogénèse et disparaissaient chez l'adulte (Millauer, 1993). Les seules cellules non endothéliales où le flk-1 a été retrouvé sont les cellules stromales du cordon ombilical (Quinn, 1993). D'autres auteurs ont démontré la présence d'ARNm de flk-1 dans les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques adultes (Yamane, 1994), les glomérules adultes
10 (Millauer, 1994) et les îlots β de Langerhans (Oberg, 1994).

De même l'inoculation concomitante de cellules tumorales et de cellules infectées par des récepteurs flk-1 dominants négatifs inhibe la croissance tumorale (Millauer, 1994).

L'un des buts de l'invention est de proposer l'utilisation d'anticorps anti-
15 idiotypes de facteurs de croissance à affinité pour l'héparine permettant de cibler spécifiquement sur l'un ou l'autre de leurs récepteurs un nouveau type d'agonistes circulants.

L'un des autres aspects de l'invention est de fournir des agonistes de récepteurs de facteurs de croissance ayant une spécificité appropriée et une longue
20 durée de demi-vie.

L'un des autres buts de l'invention est de fournir des images internes des domaines de liaison du VEGF à KDR qui du fait de leur structure immunoglobulinique sont circulants.

L'invention concerne des anticorps anti-idiotypiques du facteur de
25 croissance endothéliale vasculaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, soit pour inhiber l'angiogénèse, soit pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, ou pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules
30 endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.

L'expression "cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse" signifie cellules endothéliales migrant à travers la lame basale et se multipliant.

Pour déterminer si des cellules sont engagées dans un processus
35 d'angiogénèse, on peut avoir recours à l'immunomarquage à l'aide d'anticorps dirigés contre l'intégrine $\beta 3$ (Brooks et al., Cell, 1994, 79:1157-1164).

L'expression "cellules endothéliales quiescentes" signifie cellules endothéliales des vaisseaux adultes normaux, non angiogéniques.

L'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire pour la préparation d'un médicament destiné
5 au traitement de pathologies impliquant les cellules endothéliales angiogéniques, par stimulation sélective du récepteur KDR.

L'expression "cellules endothéliales angiogéniques" désigne les cellules impliquées dans un processus d'angiogénèse.

Les anticorps anti-idiotypes de l'invention reconnaissent le récepteur
10 humain KDR (ou le récepteur murin flk-1), mais ne reconnaissent pas le récepteur flt-1.

Grâce aux anticorps anti-idiotypiques de l'invention, on a pu mettre en évidence le fait que KDR (resp. flk-1) est la cible de l'angiogénèse pathologique.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation
15 d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, pour inhiber l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, lequel anticorps anti-idiotypique est couplé à une toxine dont la fonction est de bloquer la traduction
20 des protéines.

Comme toxine, on peut citer la saporine, la ricine ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale
25 vasculaire selon pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, pour inhiber l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, lequel anticorps anti-idiotypique est sous forme de son fragment Fab.

Comme pathologies dont le traitement nécessite l'inhibition de
30 l'angiogénèse, on peut citer le cancer, les rétinopathies diabétiques et le rejet de greffes de cornée.

L'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un
35 processus d'angiogénèse pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes.

Comme pathologies dont le traitement nécessite la stimulation de l'angiogénèse, on peut citer la cicatrisation, la reperfusion de territoires ischémiés lors de thrombose artérielle ou veineuse.

L'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques pour la
5 préparation d'un médicament destiné à stimuler l'angiogénèse physiologique pour augmenter la vitesse de la formation des vaisseaux sanguins au cours de la cicatrisation, de la maturation du corps jaune de l'ovaire ou stimuler l'angiogénèse au cours de pathologies obstructives des vaisseaux afin de reperfusionner des territoires ischémiés lors de thrombose vasculaire.

10 Les anticorps anti-idiotypes de l'invention peuvent également être utilisés pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.

La mise en évidence de l'absence de réaction des tissus sains à la stimulation de KDR par voie générale ouvre la voie à la cartographie de territoires
15 exprimant le KDR ou le flk-1. Une injection de d'anticorps anti-idiotypiques iodés du facteur de croissance endothéliale vasculaire peut permettre de visualiser des tumeurs sans liaison à des organes sains.

L'invention concerne un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance endothéliale vasculaire caractérisé en ce qu'il est un ligand du récepteur
20 humain KDR ou du récepteur murin flk-1 et qu'il n'est pas un ligand de flt.

L'invention concerne des anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire caractérisés en ce qu'ils présentent les propriétés suivantes :

- ils sont spécifiques vis-à-vis de KDR,
- 25 - ils sont circulants,
- ils présentent une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- ils induisent la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 200 kDa,
- 30 - ils induisent la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- ils n'induisent pas la migration de cellules endothéliales,
- ils stimulent l'angiogénèse,
- ils ne provoquent pas d'hypotension artérielle,
- ils n'affectent pas la perméabilité des vaisseaux.

35 La spécificité vis-à-vis de KDR peut être déterminée selon le test de compétition avec le VEGF radioiodé vis-à-vis de sa liaison à des cellules COS

transfectées avec des vecteurs d'expression eucaryote contenant la séquence du KDR (Terman et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 187:1579-1586).

A la différence des anticorps anti-idiotypiques de l'invention, VEGF n'est pas spécifique vis-à-vis de KDR puisqu'il peut se lier au récepteur flt.

5 L'intérêt de la spécificité des anticorps anti-idiotypes de l'invention est de cibler sur les cellules endothéliales angiogéniques des drogues qui n'affectent pas les cellules endothéliales quiescentes.

L'expression "circulant" signifie véhiculé librement dans le sang circulant et non capté par les parois vasculaires.

10 A la différence des anticorps anti-idiotypes de l'invention, VEGF n'est pas circulant. L'intérêt de ce que les anticorps anti-idiotypes de l'invention soient circulants est de cibler sur les cellules endothéliales angiogéniques des drogues qui n'affectent pas les cellules endothéliales quiescentes.

S'agissant de la durée de demi-vie des anticorps anti-idiotypiques, elle est
15 variable d'une espèce à l'autre ; par exemple pour le rat, elle est de 7 jours.

La durée de demi-vie des anticorps de l'invention peut être mesurée selon le test suivant : injection intraveineuse de 1 μ Ci de ligand radioiodé, puis recueil à différents intervalles de temps de sang et comptage de la radioactivité. La durée de demi-vie correspond au temps nécessaire pour que 50% de la radioactivité initiale
20 ait disparu du sang circulant.

La durée de demi-vie du VEGF est inférieure à 6 minutes (Beuters et al., Circulation, 1995); la durée de demi-vie des IgG est de l'ordre de 23 jours.

La protéine de 200 kDa sur laquelle les anticorps-anti-idiotypiques induisent la phosphorylation d'une tyrosine est KDR.

25 Cet aspect signifie que l'activation de KDR par les anticorps anti-idiotypes peut déclencher des fonctions nécessitant la phosphorylation de KDR.

Cet aspect peut être mesuré par le test de phosphorylation décrit dans les exemples.

L'induction de la prolifération des cellules endothéliales vasculaires
30 signifie qu'elles se multiplient.

Ceci peut être déterminé selon le test décrit dans les exemples.

Les anticorps de l'invention induisent la prolifération des cellules endothéliales vasculaires plus fortement que VEGF, c'est-à-dire dans un rapport d'environ 2 fois.

35 L'intérêt de cette augmentation de l'induction de la prolifération des cellules endothéliales par les anticorps anti-idiotypiques de l'invention est que la

liaison des anticorps anti-idiotypes au récepteur KDR suivie de la phosphorylation sur une tyrosine de KDR suffit à déclencher la prolifération cellulaire.

L'absence de migration des cellules endothéliales signifie que les anticorps anti-idiotypes miment, parmi les effets déclenchés par le VEGF, ceux qui sont
5 médiés par KDR et non ceux qui sont médiés par flt-1.

Cet aspect peut être mesuré par le test décrit dans les exemples.

A la différence des anticorps de l'invention, VEGF induit la migration des cellules endothéliales.

L'intérêt présenté par les anticorps de l'invention est de démontrer leur
10 absence d'effet sur le récepteur flt-1 grâce aux tests de migration et de perméabilité explorant la fonction de flt-1.

La stimulation de l'angiogénèse signifie que la liaison des anticorps anti-idiotypes au récepteur KDR suivie de la phosphorylation sur une tyrosine de KDR et de la prolifération cellulaire suffisent à déclencher l'angiogénèse.

15 Ceci peut être quantifié par le test décrit dans les exemples.

Le fait que les anticorps de l'invention n'affectent pas la perméabilité des vaisseaux signifie que les anticorps anti-idiotypes miment, parmi les effets déclenchés par le VEGF, ceux qui sont médiés par KDR et non ceux qui sont médiés par flt-1, par exemple la perméabilité vasculaire.

20 Ceci peut être déterminé selon le test suivant : des cellules endothéliales de cornée sontensemencées (40 000 cellules/cm²) sur des filtres (12 mm de diamètre) préalablement incubées 16 heures à 4°C avec du PBS supplémenté de 2 mg/ml de gélatine (Millicell-Millipore). Les puits sont disposés dans des boîtes de 24 puits (diamètre 16 mm). Après 5 jours, la résistance électrique entre le
25 compartiment intracellulaire et extracellulaire est mesurée (de l'ordre de 180 Ω). Les modulateurs sont ajoutés et la résistance mesurée toutes les 10 minutes. Sous l'effet de VEGF (5-50 ng/ml) la résistance chute à 150 m en 90 minutes environ. Une diminution de la résistance traduit donc une augmentation de la perméabilité. Cette fonction est médiée par le récepteur flt-1 et non le récepteur KDR.

30 A la différence des anticorps de l'invention, VEGF affecte la perméabilité des vaisseaux. L'intérêt de l'invention est donc de montrer que les anticorps anti-idiotypes ne stimulent pas *in vivo* les effets médiés par le récepteur flt-1.

L'invention concerne également le fragment Fab des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention.

35 L'invention concerne également le complexe entre un anticorps anti-idiotypique selon l'invention et une toxine, en particulier choisie parmi la saporine,

la ricine ou bien entre un anticorps anti-idiotype selon l'invention et un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131.

L'invention a également pour objet un anticorps anti-idiotypique selon l'invention, susceptible d'être obtenu selon le procédé suivant :

- 5 - on injecte du VEGF purifié chez un animal, notamment un lapin,
- on prélève le sang pour récupérer les Ig purifiées contenant des IgG anti-VEGF spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A, puis dans une étape éventuelle, on purifie les IgG anti-VEGF spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le VEGF,
- 10 - on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites IgG anti-VEGF purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de VEGF, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même origine que celui utilisé lors de l'injection de VEGF,
- on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la
- 15 protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorbitions :
 - . une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig pré-immunes du lapin qui a servi à faire les IgG anti-VEGF, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,
 - . une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des
 - 20 IgG anti-VEGF, pour purifier les anti-idiotypes.

Pour faire la preuve de l'action *in vivo* des anti-idiotypes de l'invention, seule la purification sur protéine A sépharose est nécessaire.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un anticorps anti-idiotypique selon l'invention, caractérisé en ce que :

- 25 - on injecte du VEGF purifié chez un animal, notamment un lapin,
- on prélève le sang pour récupérer les Ig purifiées contenant des IgG anti-VEGF spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A, puis dans une étape éventuelle, on purifie les IgG anti-VEGF spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le VEGF,
- 30 - on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites IgG anti-VEGF purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de VEGF, notamment dans les ganglions poplités de lapin de la même origine que celui utilisé lors de l'injection de VEGF,
- on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la
- 35 protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorbitions :

. une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig pré-immunes du lapin qui a servi à faire les IgG anti-VEGF, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,

5 . une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des IgG anti-VEGF, pour purifier les anti-idiotypes.

Pour préparer les fragments Fab des anticorps de l'invention, on peut procéder de la façon suivante : les fragment Fab sont préparés à partir de 200 mg d'Ig2 Id dissoutes dans 42 ml contenant 3,5 mg de papaine et 0,1 M EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) et 0,1 M de cystéine. Le mélange est incubé
10 4 heures à 37°C, puis la réaction est arrêtée par 4,6 ml de iodacétamide 0,3 M. Le mélange est alors dialysé contre 2 litres de PBS à 4°C pendant 16 heures, puis chromatographié sur une colonne de 10 ml de protéine A sépharose. Les fragments Fab sont récupérés dans le volume mort.

L'invention est également relative à des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent à titre de substance active au moins un
15 anti-idiotype selon l'invention, ou au moins un fragment Fab selon l'invention ou au moins un complexe selon l'invention.

L'invention est également relative à des compositions pharmaceutiques déduites des séquences des domaines hypervariables des fragments Fab des anticorps anti-idiotypes.
20

L'invention est également relative à des compositions pharmaceutiques déduites de la structure tridimensionnelle des fragments Fab des anticorps anti-idiotypes déterminée par cristallographie et diffraction aux rayons X, dichroïsme circulaire, résonance magnétique nucléaire.
25

DESCRIPTION DES FIGURES :

La Figure 1 représente l'inhibition de la liaison du VEGF iodé à ses récepteurs par l'anticorps anti-idiotypique J. On en conclut que l'anticorps J ne
30 déplace pas la liaison de VEGF au récepteur flt-1.

Les concentrations indiquées de VEGF ou anti-Id J sont incubées avec des cellules COS transfectées 48 heures au préalable par 1 µg/ml de vecteur pSV7d contenant la séquence de flt-1 (partie A de la Figure) ou de flk-1 (partie B de la Figure) en présence de 1 ng/ml (partie A de la Figure) ou de 10 ng/ml (partie B de la Figure) de VEGF iodé à 4°C. Après 3 heures les cellules sont rincées, lysées et
35 la radioactivité est comptée dans un compteur gamma.

La figure 2A représente l'inhibition de la liaison du VEGF à son récepteur de haute affinité par la transfection de cellules FBAE par des oligonucléotides antisens de KDR

Des cellules FBAE subconfluentes ensemencées dans des plaques de 12 puits sont transfectées avec 2 μ M d'oligonucléotides sens (\square) ou antisens (\diamond) de KDR. 24 heures après les cellules sont incubées pendant trois heures à 4°C en présence de concentrations croissantes de VEGF iodé dans un volume final de 500 μ l. On en conclut que J ne se lie pas aux cellules n'exprimant pas flk-1.

La Figure 2B représente l'inhibition de la liaison du VEGF à son récepteur de haute affinité sur des cellules FBAE par une pré-incubation avec l'anti-idiotyp J (anti-Id J).

Des cellules FBAE subconfluentes sont ensemencées dans des puits de 10 cm² et incubées pour une internalisation avec 5 μ g/ml d'anti-Id J ou d'IgG pré-immunes à 37°C pendant 90 mn. Les plaques sont ensuite transférées à 4°C et incubées avec des concentrations variables de VEGF iodé. La liaison non spécifique est déterminée en présence de 1 μ g/ml de VEGF froid (encart). Les données sont ensuite exprimées selon la représentation de Scatchard. On en conclut que J se lie à flk-1 et seulement à flk-1.

La Figure 3 représente l'induction de la phosphorylation par l'anti-idiotyp J sur des résidus tyrosine de KDR/flk-1 dans des cellules FBAE.

Des cellules FBAE sont stimulées 10 mn à 37°C par des IgG pré-immunes, du VEGF ou de l'anti-Id J, puis elles sont lysées en tampon RIPA et le lysat est immunoprécipité avec un anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine (PY22). Les immuns complexes sont collectés sur des billes de protéine A sépharose, soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide, transférés sur un filtre de nitrocellulose et révélés soit par un anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine PY22, soit par un anticorps polyclonal anti-flk-1.

La Figure 4 représente la stimulation de la prolifération des cellules FBAE par l'anti-idiotyp J. On en conclut que J phosphoryle le récepteur flk-1 comme le fait le VEGF.

Des cellules FBAE sont ensemencées à 5000 cellules par puits dans des plaques de 12 puits en présence de VEGF, anti-Id J ou d'IgG pré-immunes à des concentrations variables allant de 0,01 ng/ml à 1000 ng/ml. Après cinq jours, les cellules sont trypsinisées et comptées. Les données représentées sont les moyennes de trois points et les expériences ont été réalisées quatre fois avec des résultats similaires. On en conclut que J stimule la prolifération des cellules FBAE.

La Figure 5 représente les effets de l'injection de Ig2 Id sur le volume tumoral.

Des fragments d'adénocarcinome prostatique hormono-indépendant correspondant à un score IX de Gleason (3x3x3 mm) ont été greffés à des souris nu/nu femelles. Un mois plus tard, quand elles deviennent cliniquement palpables, les animaux (n=8-10 pour chaque groupe) reçoivent 2 fois par semaine 200 µg d'Ig1 T neutralisant l'activité du VEGF (V-IgG), ou d'Ig1 PI (PI-IgG) ou d'Ig2 Id (J-IgG). Le volume tumoral a été mesuré 2 fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisses et les souris ont été pesées. Les animaux ont été sacrifiés 3 mois après et les tumeurs photographiées.

La Figure 6 représente l'analyse histologique (a-c), le marquage de la vascularisation (d-i) et de la prolifération (j-l) de xénogreffes d'adénocarcinome traitées par V-IgG, PI-IgG ou J-IgG.

Les animaux traités comme indiqué dans la légende de la figure 5 ont été sacrifiés 3 mois après l'implantation des xénogreffes, puis des coupes sont pratiquées dans ces tumeurs et colorées avec l'hématoxyline-éosine (a-c) Des coupes adjacentes ont été révélées avec le marqueur ulex (d-f) (*Ulex Europaeus* conjugué à la peroxydase Sigma, réf. L8146), l'anticorps anti-flt-1 (Santa Cruz) (g-i) ou mib-1 (j-l). On en conclut que J stimule le nombre de vaisseaux et la prolifération des cellules cancéreuses.

Tableau 1

	PROLIFERATION (incorporation de ³ HTDR cpm/puits)		MIGRATION (cellules/champs)	
	Sens	Antisens	Sens	Antisens
Rien	30.604±4.820	32.645±4.820	36,4±5,2	27,2±5,2
VEGF	75.098±4.511	46.223±2.104	74,0±6,1	81,2±8,1
Anti-Id J	104.355±6.212	35.462±3.874	31,2±2,1	33,4±5,4

Le tableau 1 représente les effets biologiques du VEGF et de l'anti-Id J sur des cellules FBAE transfectées par des oligonucléotides sens ou antisens de KDR.

Des cellules FBAE subconfluentes sont transfectées par des oligonucléotides sens ou antisens de KDR comme décrit dans la description ci-dessus. Vingt-quatre heures après, les cellules sont transférées en milieu sans sérum, elles sont ensuite incubées en présence de 50 pM de VEGF, l'anti-Id J ou rien, puis elles sont marquées 4 heures avec de la thymidine tritiée après 20 heures de stimulation. Parallèlement, des expériences de migration sont réalisées sur des cellules confluentes. Une incision en forme de croix de Malte est effectuée sur la monocouche cellulaire. Les puits sont lavés avec du milieu sans sérum et les cellules sont incubées avec des concentrations de modulateurs dix fois plus élevées. Vingt-quatre heures après, les cellules sont colorées au May-Grumwald-Giemsa et les cellules ayant migré sont comptées sur huit champs, chaque point est réalisé en triple. Ces expériences ont été faites trois fois avec des résultats similaires. On en conclut que J ne mime qu'une partie des effets du VEGF : il stimule la prolifération mais pas la migration.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LES EXEMPLES :

PBS (phosphate buffer saline) : solution saline de tampon phosphate.

Ig1PI : immunoglobulines de lapin purifiées par protéine A-sépharose à partir de sang prélevé avant l'immunisation par le VEGF.

Ig1T : immunoglobulines de lapin purifiées par protéine A-sépharose à partir de sang prélevé après immunisation par le VEGF.

Ig1 anti-VEGF : Ig1T purifiées par VEGF-sépharose.

Ig2 Id : immunoglobulines de lapin 2 purifiées par protéine A- sépharose à partir de sang prélevé après l'immunisation par le Ig1T.

Ig2J (également désigné par J) : Ig2 Id purifiées par Ig1 PI-sépharose puis Ig1 anti-VEGF sépharose.

METHODES D'ETUDE

1. Fabrication d'anticorps anti-idiotypes de VEGF165.

- Obtention des IgG pré-immunes (Ig1 PI) :

Avant chaque immunisation, du sang est prélevé, le sérum est fractionné immédiatement après le recueil et 15 ml de sérum sont chromatographiés sur une colonne de protéine A (0,9x18 cm). La colonne est lavée par du PBS et les immunoglobulines sont éluées par de la glycine 0,2 M tamponnée à pH 2,5, immédiatement neutralisées par adjonction de 1/5 du volume de K₂HPO₄ 1 M, puis dialysées contre du PBS. Les immunoglobulines (Ig1 PI) sont conservées à 80°C jusqu'à leur utilisation.

1.1. Obtention des anticorps anti-idiotypiques murins.

Des cellules AtT20 cultivées jusqu'à la confluence puis transférées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, réf. 13016 027) contenant 5 µg/ml d'insuline et 10 µg/ml de transferrine sont stimulées par 5 ng/ml de FGF2 recombinant produit chez *Escherichia coli* (don du Dr. Hervé Prats, U397 INSERM, Toulouse) pendant 48 heures pour augmenter la production de VEGF (Plouët, 1992).

Le milieu conditionné (30 litres) a été purifié comme décrit précédemment (Plouët, 1989). Quarante µg de VEGF murin sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante, transférés sur une feuille de nitrocellulose.

La fraction contenant le VEGF a été découpée puis dissoute dans 1 ml de diméthylsulfoxyde. Dix µg de VEGF sont émulsionnés dans 0.25 ml d'adjuvant de Freund complet puis injectés chez un lapin "Fauve de Bourgogne" (Iffa-Credo), 4 fois à 15 jours d'intervalle.

Le sang prélevé entre 3 et 7 mois après la première injection est fractionné et les Ig sont purifiées par chromatographie d'affinité pour la protéine A; ces Ig purifiées sont appelées Ig1T.

Des lapins "Fauve de Bourgogne" anesthésiés reçoivent une injection de 0,5 ml de PBS contenant du bleu Evans dans le coussinet plantaire afin de colorer le système lymphatique. Une incision cutanée est alors pratiquée, les plans cutanés libérés et le ganglion devenu bleu est alors visualisé.

Dix µg d'Ig1T (5 µl) émulsionnées dans 100 µl d'un mélange 1-1 de PBS-adjuvant de Freund complet sont injectés dans le ganglion poplité de chacun des lapins 30 minutes après.

L'injection d'adjuvant crée un granulome inflammatoire qui permet de palper le ganglion et donc de pratiquer ultérieurement des injections transcutanées

sans qu'il soit nécessaire d'inciser le plan cutané. 3, 6 et 9 semaines après les lapins reçoivent une injection intra-ganglionnaire de 10 μ g d'Ig1T.

Le sang prélevé entre 4 et 7 mois après la première injection est purifié comme décrit précédemment. Les Ig anti-idiotypes (Ig2J) sont alors purifiées par
5 une série de 2 chromatographies d'affinité, comme indiqué dans les paragraphes 2 et 3 ci-après.

1.2. Obtention des anticorps anti-idiotypiques humains

Le VEGF 165 a été produit dans des cellules CHO transfectées de façon
10 stable par un plasmide d'expression (prCEN-1, F. Bayard, Unité 397 INSERM) contenant l'ADNc du VEGF 165 (don de Judith Abraham, Scios Nova, Mountain View, CA).

Les cellules sont cultivées à confluence en milieu DMEM contenant les antibiotiques et 10% de sérum de veau nouveau-né, puis rincées 3 fois avec du
15 milieu DMEM sans sérum et incubées 48 heures dans du milieu DMEM contenant 5 μ g/ml d'insuline et 10 μ g/ml de transferrine.

Deux jours après, le milieu est collecté, centrifugé (20000g, 30 minutes) puis chromatographié sur héparine sépharose (0,9 x 6 cm) préalablement équilibrée dans du tampon Tris 0,01 M, pH 7,2 contenant 0,05 M NaCl. Après le lavage de
20 la colonne dans le même tampon, le VEGF est élué par un gradient de concentration de NaCl dans le tampon Tris. L'activité biologique du VEGF est mesurée par son activité mitogène (Plouët, 1989). Les milieux sont alors centrifugés et la quantité de VEGF produite quantifiée par radorécepteuressai et par la mesure de compétition avec le VEGF iodé vis-à-vis de la liaison à ses
25 récepteurs.

Dix μ g de VEGF sont injectés dans les ganglions poplités de lapin New-Zealand (INRA, Toulouse) comme décrit plus haut. Après 3-7 mois les Ig1T sont examinées pour leur capacité à neutraliser l'effet mitogène du VEGF sur les
30 cellules ACE (cellules endothéliales de capillaires de cortex de glandes surrénales bovines).

Des lapins co-isogéniques reçoivent des injections de 10 μ g d'Ig1T selon le protocole décrit précédemment.

2- Construction des immunoadsorbants

VEGF-sépharose

Un g de sépharose-CNBr (Pharmacia) est mis en présence avec 2 mg de VEGF préalablement dialysé contre du tampon carbonate 0,1 M pH 8,5 pendant une nuit. Après ce temps la matrice est lavée par centrifugations (2000 g, 5 minutes) 3 fois avec 10 ml de tampon carbonate. Les fonctions amines restées libres sont ensuite bloquées par incubation avec 5 ml d'éthanolamine 0,2 M. La matrice est relavée 3 fois avec du PBS, une fois avec de la glycine 0,2 M pH 2,5 pendant 5 minutes, puis avec 10 ml de K₂HPO₄. La matrice est alors conservée dans du PBS supplémenté de 0,02 % d'azoture de sodium jusqu'à utilisation.

Ig1 pré-immunes

La matrice d'affinité est préparée comme précédemment en mettant en contact 1 g de CNBr sépharose et 5 mg de Ig1PI.

Ig1 anti-VEGF

Cinquante mg d'Ig1T sont chromatographiées sur la colonne de sépharose-VEGF, éluées par de la glycine pH 2,5 0,2 M, dialysées et congelées à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Les Ig spécifiques de VEGF représentent 8 % des Ig1T.

3- Purification des Ig anti-idiotypiques.

Les Ig anti-idiotypiques purifiées sur protéine A sépharose (Ig2 Id) sont purifiées par une séquence de 2 chromatographies d'affinité : chromatographie sur Ig1PI-sépharose et une chromatographie sur Ig1 anti-VEGF-sépharose.

Ig1 PI-sépharose

Cinquante mg d'Ig2 Id sont inoculées sur la colonne d'Ig1PI-sépharose disposée dans une colonne Economo-pack (0,2x1 cm). Une fois que les Ig2 ont été séparées des éventuelles Ig2 Id dirigées contre les isotypes et les allotypes de Ig1 PI, donc liées au Ig1 PI sépharose, la fraction non retenue, donc composée des Ig régulières non immunes et des Ig2 J dirigées contre les domaines des Ig1 reconnaissant le VEGF, est déposée sur une colonne d'Ig1 anti-VEGF sépharose.

On n'a jamais noté que cette procédure permettait de séparer une quantité mesurable d'Ig anti-isotypes et anti-allotypes.

Ig1 anti-VEGF-sépharose

Les Ig anti-id non retenues sur la colonne d'Ig1PI, donc déplétées des éventuels anticorps anti-isotypes et anti-allotypes, sont inoculées sur la colonne d'Ig1 VEGF-sépharose disposée dans une colonne Economo-pack (0,2x1 cm).

La colonne est ensuite lavée avec 10 ml de PBS, puis les Ig retenues sont éluées avec de la glycine 0,2 M pH 2,5, immédiatement neutralisées avec un cinquième du volume avec K₂HPO₄ 1 M, puis dialysées contre du PBS.

Cette procédure permet de purifier des immunoglobulines anti-idiotypiques (Ig2J) qui représentent 2-3 % des Ig2 Id totales.

4- Etude de la spécificité des anticorps

Le criblage des anticorps anti-idiotypes s'effectue selon la séquence suivante mise au point au laboratoire:

Des cellules COS ensemencées à 30 000 cellules par puits de 2 cm² sont cultivées en milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Deux jours après les cellules sont transférées en milieu ne contenant ni sérum ni antibiotiques et incubées avec 2 µg/ml de plasmide pSV7d contenant l'ADNc de flt-1 ou de flk-1 (dons de L. Williams, UCSF) et 10 µg/ml de lipofectine pendant 30 minutes.

Après 6 heures, le milieu est remplacé par du DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal pendant 48 heures.

La liaison de VEGF radioiodé (1-2 10⁵ cpm/ng) aux cellules COS transfectées est mesurée à 4 °C. Les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon de liaison (DMEM contenant 20 mM Hepes et 1 mg/ml de gélatine ajustée à un pH de 7.4. Les concentrations désirées de VEGF iodé (1 ng/ml pour les cellules COS/flt-1 et 10 ng/ml pour les cellules COS/flk-1) sont ajoutées avec des concentrations variables de VEGF non marqué ou d'Ig2 Id ou Ig2 J sous un volume final de 0.5 ml. La liaison non spécifique est déterminée en présence d'un excès -500 ng- de VEGF purifié. Les liaisons totale et non spécifique sont déterminées en double.

Après deux heures les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon froid. et lysées avec 0.5 ml de NaOH 0.2 M. L'iode 125 contenu dans le matériel solubilisé est compté dans un compteur gamma.

En parallèle des cellules FBAE (foetal bovine aortic endothelial cells) ensemencées à 100 000 cellules par puits de 10 cm² sont cultivées en milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal et 100 UI/ml de pénicilline et 50 mg/ml de streptomycine. 2 jours après les cellules sont transférées en milieu ne contenant ni sérum ni antibiotiques et incubées avec 10 mg/ml d'oligonucléotides sens ou antisens du KDR préalablement incubés avec 10 mg/ml de lipofectine pendant 30 minutes.

Après 6 heures, le milieu est remplacé par du DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal. pendant 24 heures. Des cellules FBAE subconfluentes non transfectées sont aussi incubées 90 minutes avec les IgG anti-idiotypiques ou les Ig1 PI. Les cellules sont alors transférées à 4°C puis incubées 3 heures avec des concentrations variables de VEGF iodé en présence (liaison non spécifique) ou absence (liaison totale) de 1 µg/ml de VEGF. Les données sont alors analysées selon la représentation de Scatchard (Scatchard, 1949) par le programme de Munson (Munson, 1980).

10 5. Activités biologiques des anticorps

Phosphorylation des récepteurs

Des cellules FBAE sont stimulées 10 mn à 37°C avec 1 nM de VEGF ou Ig2 J puis elles sont lysées en tampon RIPA (Tris 50 mM pH 7,5, Nonidet P 40 Sigma, réf. N6507, 1%, EDTA 1 mM, 5 µg/ml de chacun des inhibiteurs de protéases suivants : benzamidine, pepstatine, leupeptine, aprotinine et le lysat est immunoprécipité avec un anticorps monoclonal anti- phosphotyrosine (PY22, Amersham). Les immuns complexes sont collectés sur des billes de protéine A-sépharose puis séparés par une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéines sont transférées sur un filtre de nitrocellulose et révélées par soit l'anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine PY22 (figure 3), soit par un anticorps polyclonal commercial (Santa-Cruz) anti-flk-1 (figure 3).

Prolifération

Des cellules FBAE ensemencées à 20 000 cellules par puits de 4 cm² sont cultivées en milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal et 100 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Deux jours après les cellules sont transférées en milieu ne contenant ni sérum ni antibiotiques et incubées avec 10 µg/ml d'oligonucléotides sens ou antisens du KDR préalablement incubés avec 10 µg/ml de lipofectine pendant 30 minutes.

Après 6 heures, le milieu est remplacé par du DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal. 24 heures après les cellules sont transférées en milieu sans sérum puis alors incubées en présence de 50 pM de VEGF, d'Ig2 J ou de PBS seul. Entre la 68ème et la 72ème heure 1 microcurie (µCi) de thymidine tritiée est ajouté. Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS à 4 °C, 1 fois avec de l'acide trichloracétique dilué à 10%, puis lysées dans NaOH 0.2 M. Le lysat est alors compté à l'aide d'un compteur à scintillation. .

Dans des expériences similaires, des cellules FBAE sont ensemencées à 5000 cellules par puits dans des plaques de 12 puits en présence de VEGF, Ig2 J ou Ig1 PI à des concentrations variables allant de 0,01 ng/ml à 1000 ng/ml. Après cinq jours, les cellules sont trypsinisées et comptées. Les données représentées sont les moyennes de trois points et les expériences ont été réalisées quatre fois avec des résultats similaires.

Migration

Des cellules ACE sont ensemencées à 100 000 cellules par puits de 4 cm².
10 Des cellules sont enlevées de la monocouche selon une aire représentant une croix de Malte à l'aide d'un cône de surface calibrée. Les cellules sont rincées et incubées avec des concentrations de modulateurs (VEGF, Ig2 J, PBS) dix fois plus élevées que celles utilisées pour les expériences de prolifération. 24 heures après les cellules sont colorées au May-Grumwald-Giemsa et les cellules ayant migré
15 sont comptées sur huit champs, chaque point étant réalisé en triple. Ces expériences ont été faites trois fois avec des résultats similaires.

Effet biologique sur la perméabilité :

Des cellules endothéliales (10⁵/cm²) de cornée sont déposées sur des
20 filtres (diamètre 0,45 m, Transwell*, Costar) préalablement incubés avec 1 mg/ml de collagène type 1 dissous dans du PBS. Le filtre est alors déposé dans un puits de boîte de culture multipuits (Nunc) contenant 0.5 ml de milieu DMEM et 15% de sérum de veau foetal dans la chambre supérieure et la chambre inférieure. Trois jours après que les cellules aient atteint la confluence, les cellules sont rincées et
25 incubées dans du milieu sans sérum. La résistance de la couche de cellules est mesurée (appareillage Millicel*, Millipore). Dans 3 séries de puits identiques (3 puits par condition), 20 ng/ml de VEGF ou de facteur de croissance du placenta (qui ne se lie qu'au récepteur flt-1) ou 200 ng d'anticorps Ig2 J immunopurifié sont incubés dans la chambre supérieure et la résistance est mesurée toutes les
30 10 minutes. La résistance diminue dès 15 minutes, est minimale à 30 minutes et augmente ensuite pour atteindre son niveau de base après 90 minutes uniquement dans les puits traités par VEGF ou le facteur de croissance du placenta, et pas dans ceux traités par Ig2 J.

Ces résultats montrent que, la résistance diminuant, la perméabilité
35 augmente par un mécanisme secondaire à l'activation du récepteur flt-1. Ig2 J ne se liant pas à flt-1, il n'affecte effectivement pas la perméabilité.

Hypotension :

Le VEGF injecté par voie intravasculaire déclenche une hypotension, pas les anticorps anti-idiotypes du VEGF (qui n'agissent que sur les cellules endothéliales ayant acquis un phénotype angiogénique).

5

Angiogenèse cornéenne

Des lenticules imprégnés de 2 μ l de véhicule (PBS contenant 50 mg de sérum albumine bovine) ou de véhicule et 200 ng de VEGF ou 600 ng d'Ig2 J sont insérés dans le stroma cornéen à 2 mm du limbe chez des lapins New-Zealand. Après 12 jours la surface néovascularisée en regard de l'implant est quantifiée sur une échelle de 0 à 4 (Favard, 1992).

10

Angiogenèse tumorale

Un adénocarcinome prostatique (grade IX de Gleason) a été propagé sériellement chez des souris immunodéprimées (Iffa-Credo). Un mois après les souris ont reçu 2 fois par semaine une injection intrapéritonéale de 200 μ g d'Ig1T ou IgG1 PI ou Ig2 Id (toutes Ig purifiées par affinité pour la protéine A sépharose). Les tumeurs ont été mesurées 2 fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées 2 mois après. Les coupes de tumeurs ont été incubées avec des anticorps Mib-1 (Immunotech) qui ne marquent que les cellules en phase mitotique, la lectine ulex (European) conjuguée à la peroxydase (Sigma) qui ne marque que les cellules endothéliales; et l'anticorps anti-flt-1.

20

RESULTATS

Aucun sérum pré-immun (n=18) ne contenait d'IgG interférant avec la liaison du VEGF iodé sur des cellules COS transfectées par des vecteurs d'expression des récepteurs flt-1 ou flk-1. En revanche 20% des sérums anti-idiotypiques contiennent des IgG se liant à flk-1. Une préparation d'Ig2 Id purifiées à partir de sérum recueilli entre 4 et 7 mois après l'immunisation a été sélectionnée (Ig2 J) qui inhibe totalement la liaison du VEGF iodé aux cellules COS transfectées avec flk-1 (la concentration qui déclenche 50% de l'inhibition est d'environ 400 ng) mais n'interfèrent pas avec sa liaison aux cellules transfectées par flt-1 (Figure 1).

30

La transfection de cellules FBAE par des oligonucléotides antisens de 15 mers centrés sur le codon d'initiation de la traduction de KDR inhibe 20-25 % des sites de liaison du VEGF iodé. L'analyse des résultats selon Scatchard a

35

montré que cette réduction de la liaison s'effectuait exclusivement sur le site de liaison de plus haute affinité 5 pM (Figure 2A). La liaison à ce site est aussi inhibée par la pré-incubation de cellules FBAE par les Ig2 J (Figure 2B).

5 Ig2 J et VEGF induisent la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 200 kDa. La révélation de cette espèce moléculaire par des anticorps dirigés contre flk-1 atteste que le récepteur flk-1 est bien phosphorylé par Ig2 J (Figure 3).

10 Ig2 J et VEGF induisent la prolifération des cellules ACE (la moitié de la prolifération maximale est obtenue avec 1,2 ng de Ig2J et 0,5 ng de VEGF) à un niveau significativement supérieur à celui obtenu en présence de VEGF correspondant à 1,8 (VEGF) et 3,1 (Ig2J) fois le nombre de cellules comptées dans les puits non stimulés (Figure 4).

En revanche Ig2 J n'induisent pas de migration des cellules endothéliales (Table 1).

15 Afin de vérifier si ces Ig modulaient l'angiogénèse, des implants contenant 200 ng de VEGF ou 600 ng de Ig2 J ou le PBS seul ont été greffés dans le stroma cornéen de lapins. 12 jours après, il n'a pas été observé de néovascularisation en regard des implants contenant le PBS seul. En revanche une néovascularisation d'intensité équivalente a été observée en regard des implants contenant 5 pmoles de
20 VEGF ou Ig2 J (2.78 et 2.45 respectivement). L'analyse histologique de la rétine n'a montré aucune réaction proliférative bien que le VEGF soit synthétisé, du moins *in vitro*, par les cellules endothéliales, les péricytes et épithéliales pigmentées.

25 Exemple 1 :

Tumeur de la prostate :

Le VEGF étant actuellement reconnu comme l'inducteur majeur de l'angiogénèse tumorale, ces Ig2 Id ont été injectées chez des souris greffées un mois auparavant des fragments d'adénocarcinome prostatique. Après 1 mois de
30 traitement par les Ig2 J, le volume des tumeurs est significativement supérieur à celui des tumeurs traitées par des Ig1 PI (Figure 5).

L'analyse immunohistochimique des coupes de tumeur a montré que ces anticorps induisent *in vivo* une prolifération cellulaire mesurée par immunohistochimie avec l'anticorps mib-1. En revanche aucune cellule positive par
35 dans les organes sains (foie, rein, poumon, rétine, cerveau) mais stimulent l'angiogénèse mesurée par le test d'implants cornéens. Ces propriétés en font un

marqueur spécifique des cellules endothéliales ayant acquis un phénotype angiogénique.

Le VEGF induit l'angiogénèse et la perméabilité. J induit l'angiogénèse mais pas la perméabilité.

5 Cela pourrait représenter un avantage majeur en thérapeutique des ischémies. Ainsi, il a été montré chez l'homme que le VEGF induit un effet bénéfique sur l'ischémie par angiogénèse et donc reperfusion des territoires ischémisés (Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R., Blair R., Haley L., Asahara T., Rosenfield K., Razvi S., Walsj K., Symes J.F. Clinical evidence of angiogenesis
10 after arterial gene transfer of VEGF 165 in patients with ischemic limb. Lancet, 1996, 348:370-374), mais il est aussi apparu une complication sous la forme d'un oedème sévère du membre traité (dû à l'action du VEGF sur la perméabilité) qui ne devrait pas se produire lors d'un traitement avec Ig2 J.

15 Exemple 2 :

Tumeur du sein :

Des souris sont ovariectomisées, puis on leur greffe un implant d'oestrogène qui ne sera actif que pendant 3 semaines. Des cellules cancéreuses humaines de cancer de sein (MCF7) déclenchent une tumeur qui s'arrête de croître
20 après 3 semaines quand les oestrogènes ne sont plus actifs. Si l'on injecte des anticorps anti-idiotypes de VEGF (agonistes du récepteur flk-1), les tumeurs continuent de croître, mais les anticorps anti-idiotypes de VEGF stimulent la vascularisation.

25 Commentaires :

Utilisation des anti-idiotypes de facteurs de croissance angiogéniques en chimiothérapie :

La chimiothérapie anticancéreuse classique vise à ralentir la prolifération cellulaire, donc à diminuer le nombre relatif des cellules à haut potentiel de
30 multiplication, en particulier les cellules cancéreuses, mais aussi des cellules normales comme celles des parois digestives. Par ailleurs, une tumeur ne peut se développer que si elle est vascularisée. Une alternative thérapeutique consisterait à réduire la vascularisation tumorale par vectorisation de toxines ou d'antimitotiques sur ces néovaisseaux à condition de choisir une cible qui ne soit pas présente sur
35 les vaisseaux normaux, ce qui fait l'objet de l'invention.

Toute tumeur ne peut se développer que si elle synthétise et relargue vers
5 les vaisseaux pré-existants des facteurs de croissance angiogéniques qui induisent la
migration, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales en
néovaisseaux. Parmi les facteurs angiogéniques, le VEGF (vascular endothelial
growth factor, c'est-à-dire facteur de croissance endothéliale vasculaire) est
actuellement reconnu comme l'acteur majeur des néovascularisations non
10 contrôlées observées dans la progression tumorale, la rétinopathie diabétique ou la
polyarthrite rhumatoïde. Or, un facteur de croissance peut induire de nombreux
effets différents selon qu'il se lie à l'un ou à l'autre de ses récepteurs, par exemple
la prolifération ou la survie. Donc, l'immunoneutralisation peut avoir des effets
bénéfiques sur l'inhibition de la néovascularisation, mais aussi des effets
15 indésirables sur la diminution de la survie de l'endothélium sain. Par ailleurs, la
demi-vie du VEGF est de 3 minutes. Il ne circule pas et ne peut donc atteindre sa
cible après injection par voie systémique.

La construction d'agonistes de récepteurs du VEGF doit donc répondre à
deux impératifs de spécificité et de biodisponibilité. Pour cela, on a mis à profit la
20 réponse idiotypique pour obtenir des images internes des domaines de liaison du
VEGF à KDR, qui, du fait de sa structure immunoglobulinique, est circulant.

Résultats obtenus :

La présente invention propose un protocole de fabrication d'agonistes
5 spécifiques de récepteurs de facteurs de croissance utilisables par voies
systémiques. On a ainsi obtenu des agonistes spécifiques du récepteur KDR du
VEGF.

L'agoniste du récepteur KDR :

- 10 - induit la néovascularisation de tumeurs d'adénocarcinomes de prostate et
de sein,
- n'induit pas la prolifération indésirables de l'endothélium sain,
 - n'induit pas la perméabilité capillaire à la différence du VEGF,
 - n'induit pas d'hypotension à la différence du VEGF.

REFERENCES

Folkman J:How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue. Cancer Res. 1986;46:467-479.

Plouët J, Schilling J, Gospodarowicz D:Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20. EMBO J., 1989, 8, 3801-3806.

Ferrara N, Henzel WJ:Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem. Bioph. Res. Commun. 1989;161:851-856.

Conn G, Soderman DD, Schaffer MT, Wile M, Hatcher VB, Thomas KA:Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. Proc.Natl.Acad.Sci, 1990;87:1323-1327.

Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J:Human Vascular Permeability Factor. J. Biol. Chem, 1989;264:20017-20024.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DW, Ferrara N: Vascular Endothelial Growth Factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246:1306-1309.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT:Vascular Permeability Factor, an Endothelial Cell Mitogen Related to PDGF. Science 1989;246:1309-1312.

Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchel R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA:Vascular Endothelial Growth Factor: a new member of the Platelet-Derived Growth Factor Gene Family. Biochem. Bioph. Res Commun. 1989;165:1198-1206.

De Vries C, Escobedo J, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Lewis LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.

Terman BI, Vermazen MD, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;34:1578-1586.

Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W, Ullrich A: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-846.

Quinn TP, Peters KG, DeVries C, Ferrara N, Williams LT: Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:7533-7537.

Peters KG, DeVries C, Williams LT: Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:8915-8919.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gilett N, Philips HS, Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-844.

Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W., Ullrich, A. 1994. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative flk-1 mutant. *Nature*. 367:576-579.

Folkman, J. 1993. Diagnostic and therapeutic applications of angiogenesis research. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 316:914-918.

Oberg, C., Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Welsh, M.,
1994

Expression of protein tyrosine kinases in islet cells :
possible role of the flk-1 receptor for b cell maturation
from duct cells.

Growth factors, 10, 115-126.

Yamane A., seetharam, L., Yamaguchi S., Gotoh, N.,
Takahashi, T., Neufeld, G., Shibuya, M.

A new communication system between hepatocytes and
sinusoidal endothelial cells in liver through vascular
endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor
family (Flt-1 and KDR/Flk-1).

Oncogene, 1994, 9, 2683-2690.

Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, reisfeld RA, Hu T,
Klier G, Cheresch DA.

integrin avb3 antagonists promote tumor regression by
inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.

Cell, 1994, 79, 1157-1164.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, soit pour inhiber l'angiogénèse, soit pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, ou pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.

2. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant les cellules endothéliales angiogéniques, par stimulation sélective du récepteur KDR.

3. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire selon l'une des revendications 1 ou 2 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, pour inhiber l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, lequel anticorps anti-idiotypique est couplé à une toxine dont la fonction est de bloquer la traduction des protéines ou lequel anticorps anti-idiotypique est sous forme de fragment Fab.

4. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire selon l'une des revendications 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes.

5. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance endothéliale vasculaire selon la revendication 3, dans lequel l'anticorps est couplé à

une toxine choisie parmi la saporine, la ricine ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131.

5 6. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques pour la préparation d'un médicament destiné à stimuler l'angiogénèse physiologique pour augmenter la vitesse de la formation des vaisseaux sanguins au cours de la cicatrisation, de la maturation du corps jaune de l'ovaire ou stimuler l'angiogénèse au cours de pathologies obstructives des vaisseaux afin de reperfusionner des territoires ischémiés
10 lors de thrombose vasculaire.

 7. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques associés à une toxine ou de fragment Fab d'anticorps anti-idiotypique pour la préparation d'un médicament
15 destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'angiogénèse telles que cancer, rétinopathies diabétiques et le rejet de greffes de cornée.

 8. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance
20 endothéliale vasculaire selon la revendication 1, pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.

25 9. Anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance endothéliale vasculaire caractérisé en ce qu'il est un ligand du récepteur humain KDR ou du récepteur murin Flk-1 et qu'il n'est pas un ligand de flt.

30 10. Anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance endothéliale vasculaire caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis de KDR,
- il est circulant,
- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment
35 d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 200 kDa,

- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- il n'induit pas la migration de cellules endothéliales,
- il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle,
- 5 - il n'affecte pas la perméabilité des vaisseaux.

11. Fragment Fab de l'anticorps anti-idiotypique selon la revendication
9.

10

12. Complexe entre un anticorps anti-idiotypique selon la revendication
9 et une toxine, en particulier choisie parmi la saporine, la ricine ou bien entre un
anticorps anti-idiotypique selon la revendication 9 et un élément radioactif tel que
15 l'iode 125 ou 131.

13. Anticorps anti-idiotypique selon la revendication 9, susceptible
d'être obtenu selon le procédé suivant :

20

- on injecte du VEGF purifié chez un animal, notamment un lapin,
- on prélève le sang pour récupérer les Ig purifiées contenant des IgG anti-VEGF spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A, puis dans une étape éventuelle, on purifie les IgG anti-VEGF spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le VEGF,
- 25 - on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites IgG anti-VEGF purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de VEGF, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même origine que celui utilisé lors de l'injection de VEGF,
- on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la
30 protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorbitions :
 - . une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin qui a servi à faire les IgG anti-VEGF, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,
 - . une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des
35 IgG anti-VEGF, pour purifier les anti-idiotypes.

14. Procédé de préparation d'un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 9, caractérisé en ce que :

- on injecte du VEGF purifié chez un animal, notamment un lapin,
- 5 - on prélève le sang pour récupérer les Ig purifiées contenant des IgG anti-VEGF spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A, puis dans une étape éventuelle, on purifie les IgG anti-VEGF spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le VEGF,
- on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites IgG anti-VEGF
- 10 purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de VEGF, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même origine que celui utilisé lors de l'injection de VEGF,
- on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorbitions :
- 15 . une immunoadsorbition sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin qui a servi à faire les IgG anti-VEGF, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,
- . une immunoadsorbition sur une colonne d'affinité préparée avec des IgG anti-VEGF, pour purifier les anti-idiotypes.

20

15. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent à titre de substance active un anti-idiotype selon la revendication 9 ou 10, ou le fragment Fab selon la revendication 11 ou le complexe selon la

25 revendication 12.

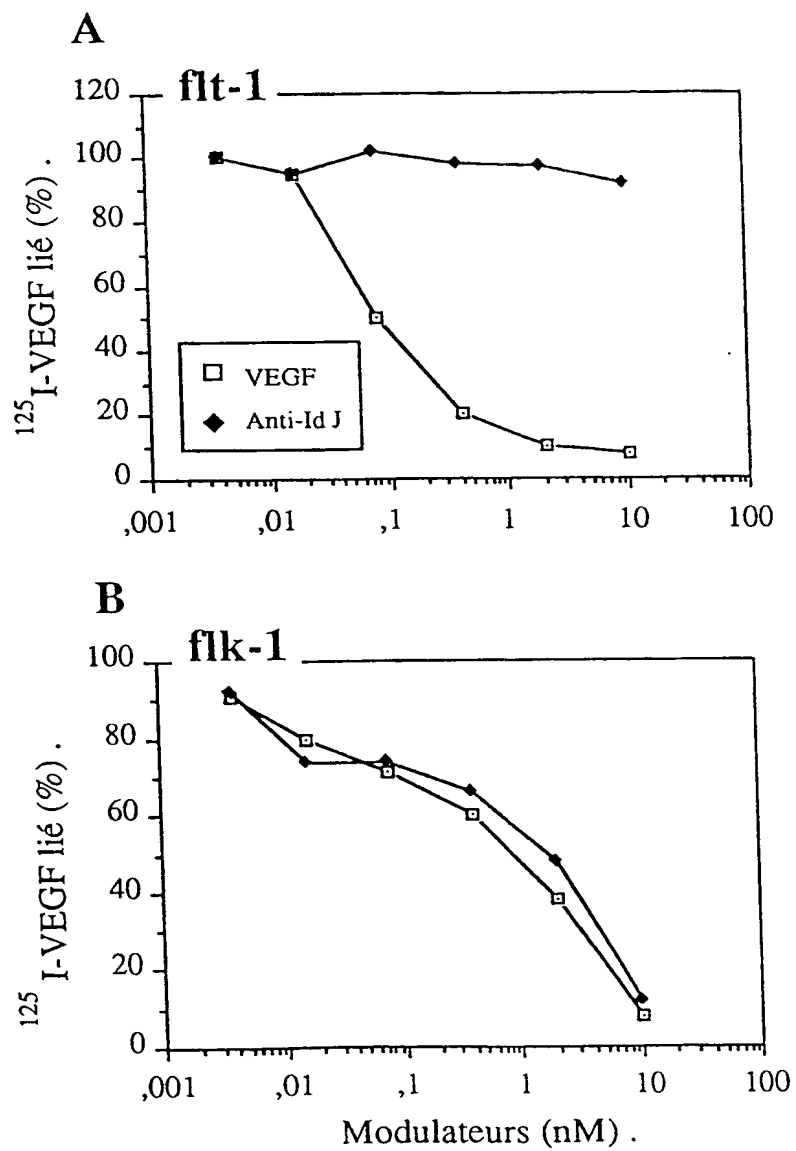
Figure 1

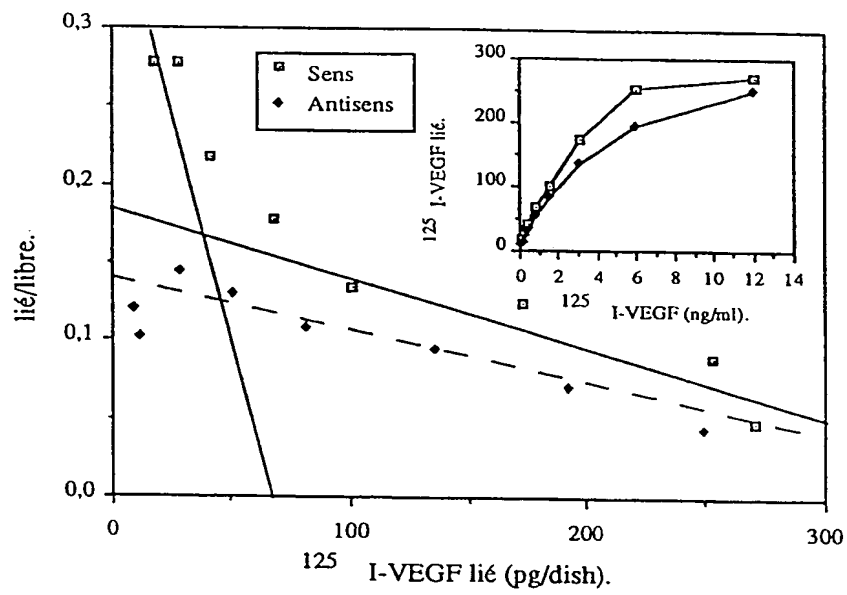
Figure 2A

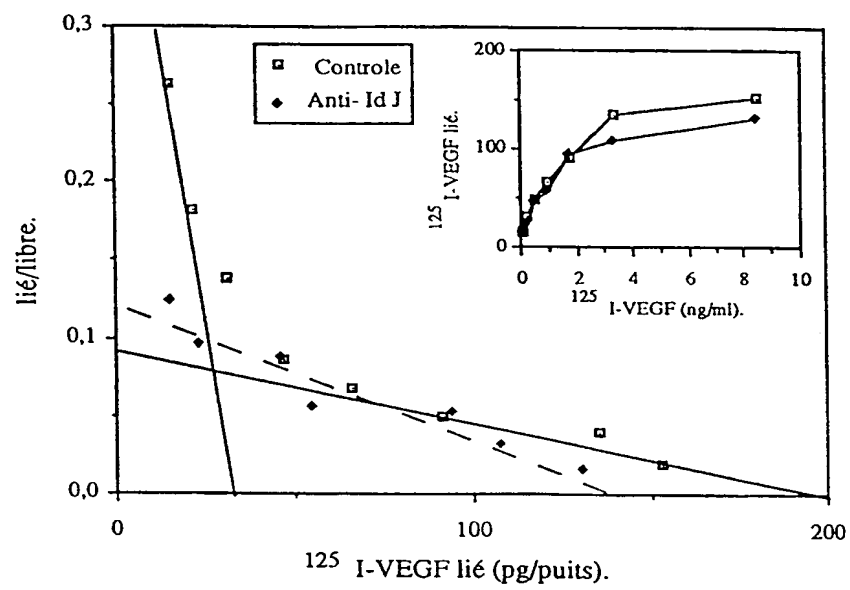
Figure 2B

Figure 3

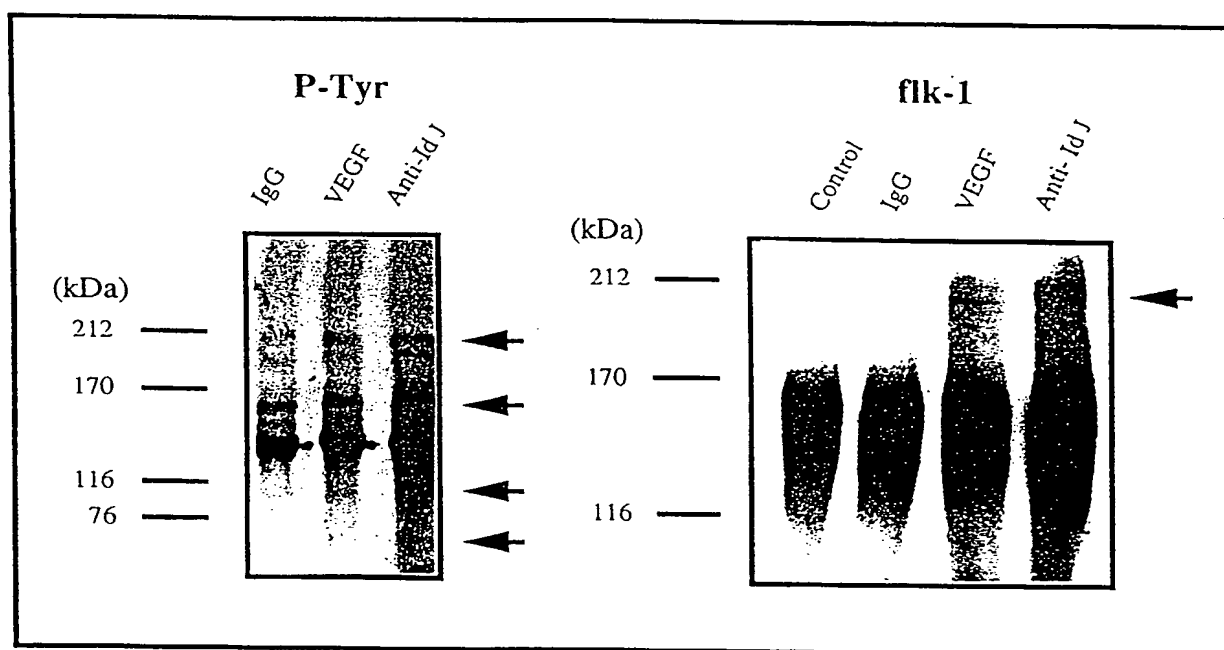


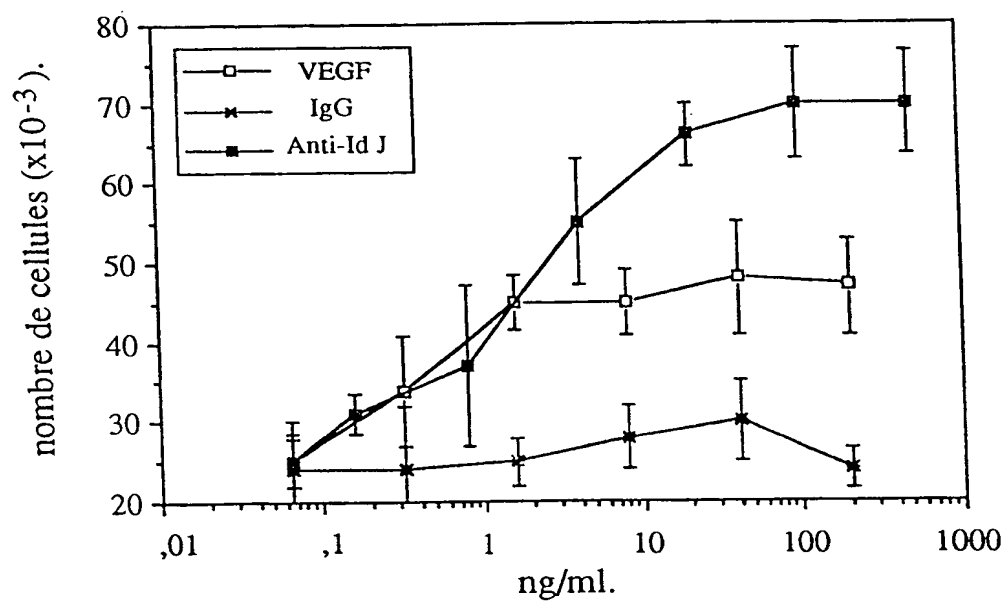
Figure 4

Figure 5

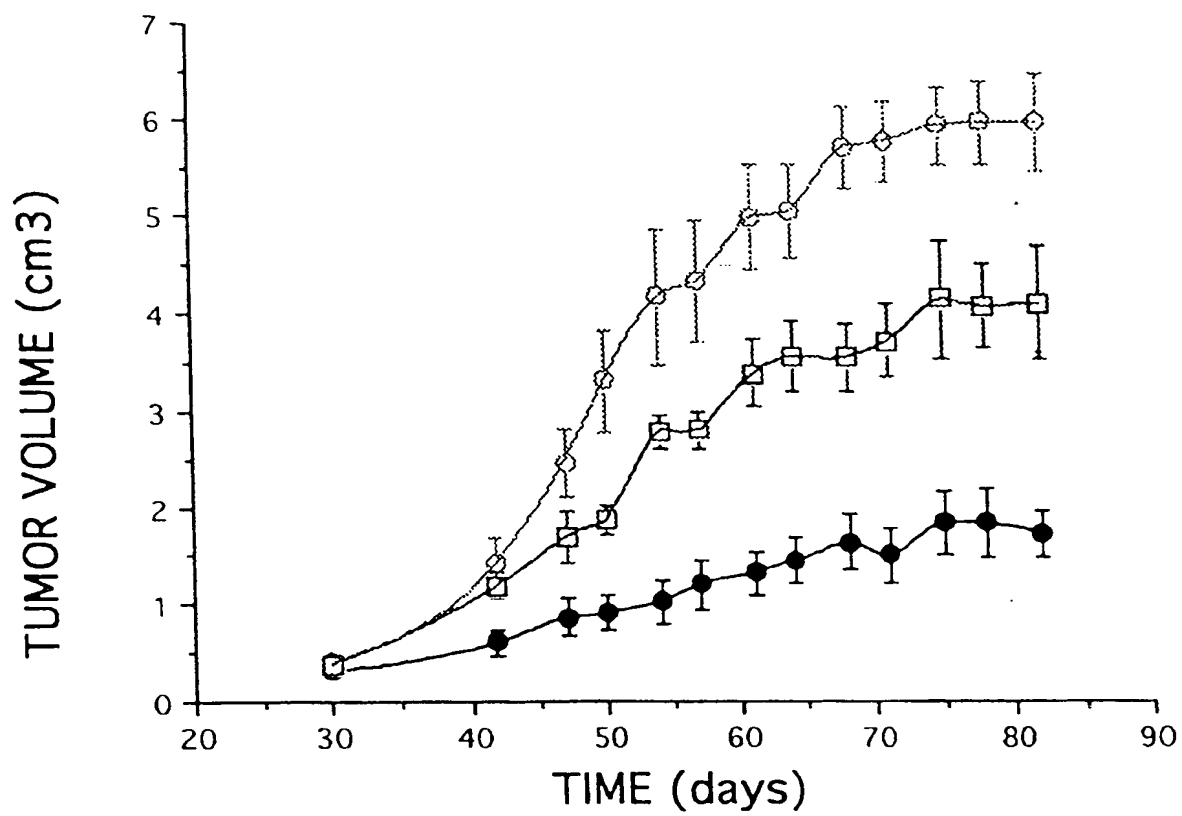
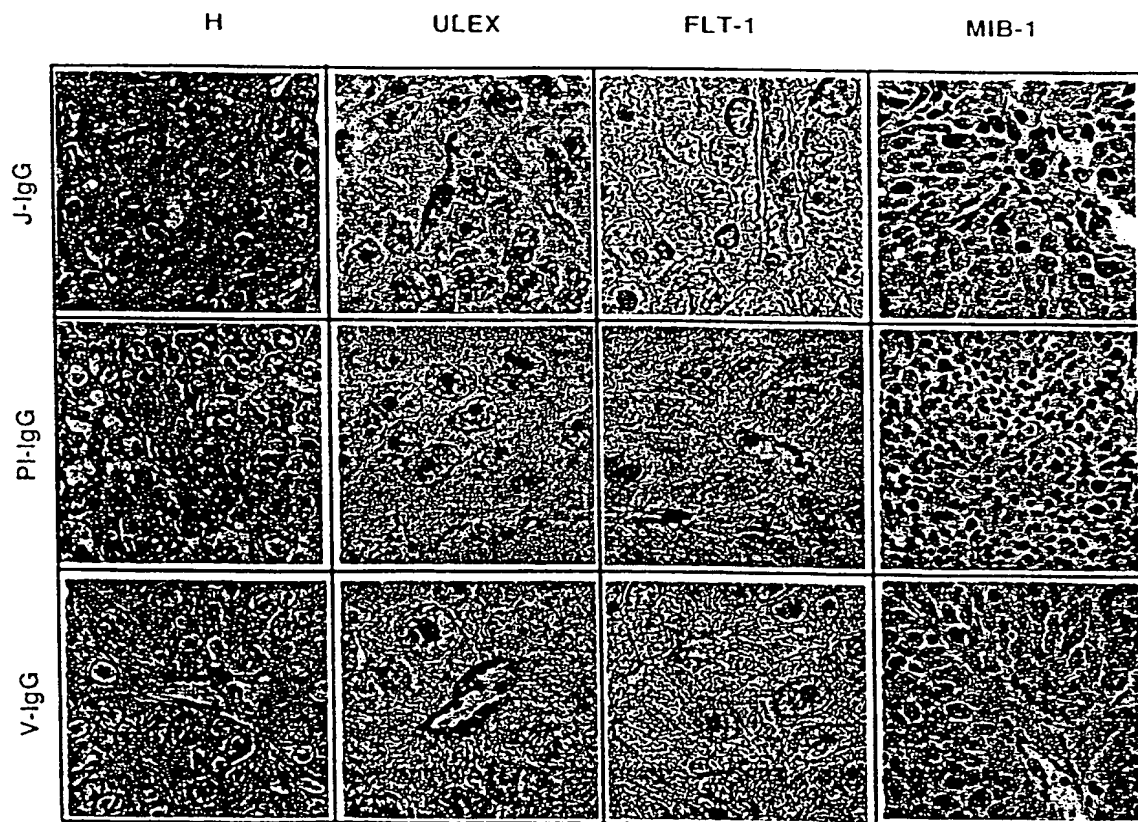


Figure 6



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference WOB95 CNR KDR	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR96/02041	International filing date (day/month/year) 20 December 1996 (20.12.1996)	Priority date (day/month/year) 21 December 1995 (21.12.1995)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/42, A61K 39/395, 47/48, 51/10, G01N 33/53		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 June 1997 (25.06.1997)	Date of completion of this report 07 October 1997 (07.10.1997)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR96/02041

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-25, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-15, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 96/02041

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The International Preliminary Examining Authority considers that the subject matter of claims 1-15 is neither described nor suggested in the documents cited in the international search report, and thus complies with the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

Document D1 (J. Cell. Biochem. Sup. 18A, p. 328, XP000602723, abstract EZ311) describes the preparation of anti-idiotypic antibodies to VEGF, but contains no information on the properties thereof.

Indeed, in the light of the abstract of D1, the existence of anti-idiotypic antibodies to VEGF as a ligand specific for HDR (or Flk-1) instead of flt (claim 9), or having the specific features according to claim 10, was not obvious at all.

Furthermore, the essential technical features of claims 1 and 2 ("without stimulating quiescent endothelial cells" and "**selective** KDR receptor stimulation") are not mentioned anywhere in the available prior art documents.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 96/02041

Since all of these features confer a range of unexpected technical advantages to said antibodies (see pages 5-6 of the description), the subject matter of claims 1-15 involves an inventive step.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 96/02041**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: **VI.**

Document D2 (C. R. ACAD. SCI. Paris, Science de la vie 319, May 1996, pages 411-415) was published before the filing date but after the priority date of the present application.

Assuming that the priority date claimed may be granted, D2 is not part of the prior art as defined in PCT Rule 64.1.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 96/02041

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K16/42 A61K39/395 A61K47/48 A61K51/10 G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY.SUPPLEMENT 18A, 1994, page 328 XP000602723 PLOUET ET AL: "VEGF DEPENDENT TUMORAL PROGRESSION: STIMULATION BY ANTI VEGF IDIOTYPIC ANTIBODIES" * abrégé EZ311 *	1-15
A	EP 0 502 416 A (AMERICAN CYANAMID CO) 9 Septembre 1992 voir page 3, ligne 36 - ligne 53 --- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 Avril 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15. 04. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 96/02041

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 94 11499 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 26 Mai 1994 voir page 3, ligne 2 - ligne 26 voir page 23, ligne 3 - page 24, ligne 12 voir page 26, ligne 28 - page 28, ligne 33 voir page 34, ligne 11 - page 35, ligne 7 ---</p>	
A	<p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 187, 1992, pages 1579-1586, XP002013861 TERMAN ET AL: "IDENTIFICATION OF THE KDR TYROSINE KINASE AS A RECEPTOR FOR VASCULAR ENDOTHELIAL CELL GROWTH FACTOR" cité dans la demande ---</p>	
A	<p>CELL, vol. 72, 1993, pages 835-846, XP002013862 MILLAUER ET AL: " HIGH AFFINITY VEGF BINDING AND DEVELOPMENTAL EXPRESSION SUGGEST FLK-1 AS A MAJOR REGULATOR OF VASCULOGENESIS AND ANGIOGENESIS" cité dans la demande ---</p>	
A	<p>NATURE, vol. 367, 1994, pages 576-579, XP002013863 MILLAUER ET AL: "GLIOBLASTOMA GROWTH INHIBITED IN VIVO BY A DOMINANT-NEGATIVE FLK-1 MUTANT" cité dans la demande ---</p>	
A	<p>NATURE, vol. 362, 1993, pages 841-844, XP002013864 JIN KIM ET AL: "INHIBITION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-INDUCED ANGIOGENESIS SUPPRESSES TUMOUR GROWTH IN VIVO" cité dans la demande ---</p>	
A	<p>ANTI-CANCER DRUGS, vol. 5, 1994, pages 361-366, XP000601953 CHAGNAUD ET AL: "CURATIVE EFFECTS ON RAT SARCOMAS OBTAINED AFTER A TREATMENT COMBINING TWO MONOCLONAL ANTIBODIES" * page 361, abrégé, page 365, 'conclusion' * ---</p>	

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No
PCT/FR 96/02041

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>C.R.ACAD.SCI.PARIS,SCIENCE DE LA VIE, vol. 319, Mai 1996, pages 411-415, XP000601935 ORTAGA ET AL: "MODULATION DE LA PROGRESSION TUMORALE PAR DES ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DE FACTEURS ANGIOGANIQUES" voir le document en entier -----</p>	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No

PCT/FR 96/02041

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0502416 A	09-09-92	AU 659830 B	01-06-95
		AU 1400692 A	08-10-92
		CA 2064635 A	04-10-92
		JP 5252985 A	05-10-93

WO 9411499 A	26-05-94	AU 5562794 A	08-06-94
		CA 2149298 A	26-05-94
		CN 1094445 A	02-11-94
		EP 0669978 A	06-09-95
		JP 8505763 T	25-06-96

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No
PCT/FR 96/02041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K16/42 A61K39/395 A61K47/48 A61K51/10 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY.SUPPLEMENT 18A, 1994, page 328 XP000602723 PLOUET ET AL: "VEGF DEPENDENT TUMORAL PROGRESSION: STIMULATION BY ANTI VEGF IDIOTYPIC ANTIBODIES" abstract EZ311 ---	1-15
A	EP 0 502 416 A (AMERICAN CYANAMID CO) 9 September 1992 see page 3, line 36 - line 53 --- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 April 1997

Date of mailing of the international search report

15.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No
PCT/FR 96/02041

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 94 11499 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 26 May 1994 see page 3, line 2 - line 26 see page 23, line 3 - page 24, line 12 see page 26, line 28 - page 28, line 33 see page 34, line 11 - page 35, line 7 ---</p>	
A	<p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 187, 1992, pages 1579-1586, XP002013861 TERMAN ET AL: "IDENTIFICATION OF THE KDR TYROSINE KINASE AS A RECEPTOR FOR VASCULAR ENDOTHELIAL CELL GROWTH FACTOR" cited in the application ---</p>	
A	<p>CELL, vol. 72, 1993, pages 835-846, XP002013862 MILLAUER ET AL: "HIGH AFFINITY VEGF BINDING AND DEVELOPMENTAL EXPRESSION SUGGEST FLK-1 AS A MAJOR REGULATOR OF VASCULOGENESIS AND ANGIOGENESIS" cited in the application ---</p>	
A	<p>NATURE, vol. 367, 1994, pages 576-579, XP002013863 MILLAUER ET AL: "GLIOBLASTOMA GROWTH INHIBITED IN VIVO BY A DOMINANT-NEGATIVE FLK-1 MUTANT" cited in the application ---</p>	
A	<p>NATURE, vol. 362, 1993, pages 841-844, XP002013864 JIN KIM ET AL: "INHIBITION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-INDUCED ANGIOGENESIS SUPPRESSES TUMOUR GROWTH IN VIVO" cited in the application ---</p>	
A	<p>ANTI-CANCER DRUGS, vol. 5, 1994, pages 361-366, XP000601953 CHAGNAUD ET AL: "CURATIVE EFFECTS ON RAT SARCOMAS OBTAINED AFTER A TREATMENT COMBINING TWO MONOCLONAL ANTIBODIES" page 361, abstract, page 365, 'conclusion' ---</p>	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/02041

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>C.R.ACAD.SCI.PARIS,SCIENCE DE LA VIE, vol. 319, May 1996, pages 411-415, XP000601935 ORTAGA ET AL: "MODULATION DE LA PROGRESSION TUMORALE PAR DES ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DE FACTEURS ANGIOGANIQUES" see the whole document -----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/02041

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0502416 A	09-09-92	AU 659830 B	01-06-95
		AU 1400692 A	08-10-92
		CA 2064635 A	04-10-92
		JP 5252985 A	05-10-93
-----	-----	-----	-----
WO 9411499 A	26-05-94	AU 5562794 A	08-06-94
		CA 2149298 A	26-05-94
		CN 1094445 A	02-11-94
		EP 0669978 A	06-09-95
		JP 8505763 T	25-06-96
-----	-----	-----	-----